Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 4, Oct- Nov 2017, p. 491-502

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 4، مهر - آبان 1396، ص. 502-491

بهینه‌یابی بازیافت نیتروژنی در آبکافت آنزیمی پروتئین سر و بازوی ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) با استفاده از آنزیم آلکالاز

کیوان علی عسگری[1]- سکینه یگانه[2*]- سید علی جعفرپور[2]- رضا صفری[3]

تاریخ دریافت: 1394/08/11
تاریخ پذیرش: 1395/02/11

چکیده

این پژوهش با هدف بهینه‌سازی بازیافت نیتروژنی پروتئین آبکافت‌شده از سر و بازوی ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) با استفاده از آنزیم آلکالاز صورت پذیرفت. جهت بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین آبکافت‌شده از روش سطح پاسخ (RSM) بر اساس طرح باکس-بنکن استفاده شد. در این مطالعه، اثر سه فاکتور نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و pH روی بازیافت نیتروژنی به‌عنوان سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. مدل ریاضی، برازش خوبی با داده‌های آزمایش داشت، زیرا R^2 معادل 0/96 نشان داد که قسمت عمده تغییرات درون محدوده آزمایش توسط مدل، قابل توضیح است. براساس نتایج به‌دست‌آمده، شرایط بهینه عبارت بودند از دمای 52/69 درجه سانتی‌گراد، pH: 8/50 و نسبت آنزیم به سوبسترای 1/92 درصد، که منجر به بازیافت نیتروژنی معادل 36/89 درصد گردید. عدم معنی‌داری در فاکتور فقدان برازش در این مطالعه نیز گواهی بر قابلیت مدل در پیش‌بینی دامنه‌های مورد استفاده در این آزمایش می‌باشد. بررسی ترکیب آمینواسیدی پروتئین آبکافت‌شده حاصل از شرایط بهینه سر و بازوی ماهی مرکب ببری نشان داد که این پروتئین دارای ارزش غذایی بالایی است. شاخص شیمیایی پروتئین آبکافت‌شده‌ی سر و بازوی ماهی مرکب نیز نشان داد که این پروتئین دارای مقادیر بالای اسیدهای آمینه ضروری است و نیاز یک انسان بالغ را به اسیدهای آمینه ضروری (پروتئین استاندارد FAO/WHO) برآورده می‌کند، اما در مقایسه با نیازهای ماهی کپور (پروتئین استاندارد NRC)، از نظر اسیدهای آمینه فنیل‌آلانین و ترئونین، محدودکننده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آبکافت، آلکالاز، بازیافت نیتروژنی، بهینه‌یابی، ماهی مرکب

مقدمه

ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) گونه غالب رده سرپایان در آب‌های جنوب کشور است. این گونه از ماهیان مرکب، در ایران در آب‌های خلیج فارس و دریای عمان و در سراسر آب‌های جنوب کشور از استان سیستان و بلوچستان در شرق تا استان خوزستان در غرب پراکندگی دارد (ولی‌نسب، 1378). بر اساس آمار FAO میزان صید آن در ایران 5102 تن در سال می‌باشد (FAO, 2013). با مطالعات انجام‌شده از سال 1370، ماهی مرکب ببری به‌عنوان یک گونه‌ی آبزی جدید قابل استحصال صادراتی، به جامعه‌ی شیلات معرفی گردید (ولی‌نسب، 1378). در هنگام فرآوری حدود 35-30 درصد از محصول تبدیل به ضایعات (سر، بازوها و...) می‌شود که به‌عنوان منابع کم‌ارزش شناخته شده و دفع نامناسب آن باعث آلودگی زیست‌محیطی می‌گردد. از طرفی بسیاری از این مواد، منابع غنی از ترکیبات با ارزش از جمله پروتئین‌ها محسوب می‌شوند (Ovissipour *et al*., 2009a; Ahmad *et al*., 2011). امروزه بکارگیری روش‌های جدید فرآوری جهت تبدیل گونه‌های کم‌مصرف و محصولات فرعی به محصولات مفید و قابل عرضه در بازار مورد توجه قرار گرفته است. یکی از گزینه‌ها برای جلو گیری از دور ریختن این ضایعات، تولید پودر پروتئین با استفاده از آبکافت آنزیمی برای مصرف انسانی در سیستم غذایی و یا با توجه به محتوای نیتروژنی آن، استفاده از آن برای تهیه محیط کشت میکروبی می‌باشد.

با توجه به اینکه ویژگی‌های پروتئین آبکافت‌شده با توجه به نوع سوبسترا، نوع و میزان آنزیم و شرایط آبکافت متفاوت می‌باشد (Kristinsson & Rasco, 2000)، بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین آبکافت‌شده می‌تواند باعث صرفه‌جویی در هزینه و میزان آنزیم مورد استفاده گردد. روش‌های آماری از قبیل روش سطح پاسخ جهت بهینه‌یابی در فرآیندهای آنزیمی به‌ویژه در صنایع غذایی (Surowka & Fik, 1992) به‌کار گرفته شده است (Haltrich *et al*., 1994).

1و 2- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار، گر.ه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری.
3- مربی پژوهشی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری.
(* - نویسنده مسئول: Email: skyeganeh@gmail.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.51100

نوع فرایند باید در کیفیت و ارزش غـذایی محصـول نهـایی در توسعه‌ی محصولات غذایی جدید در نظر گرفته شود، برای مثـال در مورد آبکافت پروتئین ماهی، درجه‌ی آبکافت بالا باعث ایجاد تلخی در محصول تولیدی می‌شود (Quaglia & Orban, 1987; Martin & Porter, 1995)، بنابراین درجه‌ی آبکافت لزوماً تنها یا بهترین پارامتر جهت بهینه‌سازی فرایند در نظر گرفته نمی‌شود (Diniz & Martin, 1997). بازیافت نیتروژنی یکی از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم‌ها در آبکافت پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود کـه بیـان- کننده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های محلول از نامحلول، و در نتیجه میزان بازدهی فرآیند در طی آبکافت آنزیمی بـوده کـه از جنبه اقتصادی نیز مهم می‌باشـد (اویسـی پـور و همکـاران.، 1389؛ Liaset *et al*., 2000; Guerard *et al*., 2002). به‌همـین منظـور، تحقیق حاضر با هدف بهینه‌سازی شرایط (نسبت آنزیم به سوبسـترا، دما و pH) تولید پروتئین آبکافت‌شده از سر و بـازوی مـاهی مرکـب، به‌منظور به‌دست آوردن بیشترین بازیافت نیتروژنی انجام شد.

مواد و روش‌ها

ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) از بازار فـروش مـاهی واقع در شهرستان کنگان استان بوشهر خریداری و شسـته شـد و در فریزر در دمای 18- درجه سانتی‌گراد منجمد شد. سپس در کنار یخ به پژوهشکده اکولوژی دریای خزر ساری انتقـال داده شـد و تـا شـروع آزمایشات در دمای 18- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. به‌منظـور آبکافت آنزیمی، از آنزیم آلکالاز با فعالیت آنزیمی 2/4 آنسون به ازای هر میلی‌لیتر آنزیم استفاده شد. آنزیم مورد استفاده از شرکت نووزایم[1] (دانمارک) خریداری و تا زمان شـروع آزمایشـات در دمـای 4 درجـه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تهیه‌ی پروتئین آبکافت شده

به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا ماهی مرکب در دمای 4 درجه سانتی‌گراد انجمادزدایی شد. سر و بازوها پس از جداسازی، ابتدا چـرخ شده، سپس با آب مقطر (نسبت 2:1 وزنـی/ حجمـی) مخلـوط و بـا همزن به مدت 2 دقیقه هموژن شـدند. ایـن مخلـوط سـپس جهـت غیرفعال‌کردن آنزیم‌های درونی در حمام آب گرم در دمای 80 درجه سانتی‌گراد به مدت20 دقیقـه قـرار داده شـد (Ovissipour *et al*., 2012). نمونه‌ها بر اساس روش سـطح پاسخ طـرح بـاکس-بـنکن، تیماربندی شدند (جداول 1 و 2) و در بن‌ماری شیکردار (W-614-B، فارتر ریز پرداز، تهران، ایران) در معرض آنزیم قرار گرفتند. نمونه‌ها در حمام آبی به مدت 15 دقیقه در دمای 90 درجه سانتی‌گراد به‌منظـور غیرفعال‌سازی آنزیم آلکالاز قرار گرفتند، و سپس به‌منظور جداسـازی مواد نـامحلول از پـروتئین‌هـای محلـول توسـط دسـتگاه سـانتریفوژ یخچـال‌دار(Hermle labrotechnik GmbH Z-206A، آلمـان)، در دمای 4 درجه سانتی‌گـراد بـا دور 8000×g بـرای مـدت 20 دقیقـه سانتریفوژ شدند.

در نهایت جهت تایید شرایط پیشنهادی معادله ریاضی، پـروتئین آبکافتی با ایجاد شرایط بهینه‌ی پیشنهادی توسط مـدل، تولیـد و بـا روش خشک‌کردن انجمادی، خشک و پودر گردید.

بازیافت نیتروژنی

بازیابی پروتئین یا بازیافت نیتروژنی با استفاده از مقدار پـروتئین به‌دست‌آمده از آبکافت به‌عنوان درصـدی از مقـدار اولیـه‌ی پـروتئین موجود در ترکیب واکنش، محاسبه شد (Ovissipour *et al*., 2012). برای تعیین میزان پـروتئین نمونـه اولیـه از روش اسـتاندارد اسـتفاده گردید (AOAC, 2005). پروتئین محلـول در سـوپرناتانت بـه روش بیورت[2] اندازه‌گیری و محاسبه شد (Layne, 1957). میـزان بازیافـت نیتروژنی بر اساس معادله زیر به‌دست آمد:

(1) 100× (مقدار پروتئین موجود در پروتئین آبکافت شـده /مقـدار پروتئین اولیه)= بازیافت نیتروژنی

تعیین ترکیب اسیدآمینه

به‌منظور تعیین ترکیب اسیدآمینه کل، ابتدا 0/1 گرم نمونـه پـودر پروتئین حاصل از شرایط بهینه به مـدت 24 سـاعت در دمـای 110 درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسیدکلریدریک 6 نرمال آبکافت شد. بعد از پایان هضم و خروج از آون، حجم درون لوله‌ی هضم با آب مقطـر به 25 میلی‌لیتر رسانیده شد. عمل مشتق‌سـازی اسـیدهای آمینـه بـا استفاده از فنیل‌ایزوتیوسـیانات بـه روش Heinrikson و Meredith (1984) انجام گردید.

میزان اسیدهای آمینه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (کنوئر، آلمان) بـا اسـتفاده از سـتون C_{18} (5 میکرومتـر، 250×4/6 میلی‌متر) با آشکارساز UV (کنوئر 2500) در طـول مـوج 254 نانومتر و دمای 27 درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. فاز متحرک مورد استفاده شامل سه حلال A (0/05 مـولار آمونیـوم اسـتات)، B (50:50 استو نیتریل آب در 0/1 مولار آمونیـوم اسـتات) و C (70:30 استونیتریل آب) و سرعت حرکت آن 1 میلی‌لیتر بر دقیقه بـود. بـرای ارزیابی نتایج از استاندارد اسیدآمینه از شرکت (21 L-Amino acids + Fluka Glysine) و نرم‌افزار EZchrom Elite استفاده گردید.

1 Novozymes Co.

2 Biuret

اندازه‌گیری شاخص شیمیایی پروتئین

شاخص شیمیایی یک فراسنجه مهم برای تشخیص ارزش تغذیه‌ای پروتئین‌ها و مقایسه آن با پروتئین استاندارد می‌باشد. شاخص شیمیایی بر اساس میزان اسیدهای آمینه ضروری در پروتئین مورد آزمایش و میزان نیاز انسان (FAO/WHO, 1990) یا یک موجود آبزی (NRC, 1993) به اسیدهای آمینه، با استفاده از رابطه زیر محاسبه می‌شود. در این پژوهش شاخص شیمیایی با نیاز ماهی کپور ارزیابی گردید.

(2) میزان اسیدهای آمینه ضروری/میزان اسیدهای آمینه ضروری در پروتئین مورد آزمایش در پروتئین استاندارد = شاخص شیمیایی

نرخ کارایی پروتئین

برای اندازه‌گیری نرخ کارایی پروتئین از معادلاتی استفاده شد که توسط Alsmeyer و همکاران (1974) و Lee و همکاران (1978) گسترش یافته است (جدول6). با قراردادن مقادیر اسیدآمینه در هر یک از این معادلات نرخ کارایی پروتئین محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

بهینه‌سازی شرایط تولید پرتئین آبکافت‌شده، با استفاده از روش سطح پاسخ بر اساس مدل باکس- بنکن انجام گردید. طبق این مدل تعداد 15 تیمار (جدول 2) توسط نرم‌افزار Design Expert 7.0.0 پیشنهاد شد که در نقطه مرکزی آزمایش 3 بار تکرار شدند. سه متغیر مستقل نسبت آنزیم به سوبسترا (X_1)، دما (X_2) و pH (X_3) در سه سطح (1+، 0، 1-) مورد آزمایش قرار گرفتند. بازیافت نیتروژنی به‌عنوان پاسخ به متغیرها در نظر گرفته شد. پاسخ سیستم آزمایشی بر اساس معادله‌ی زیر انجام گرفت:

$$Y = \beta_o + \sum_{i=1}^{3}\beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3}\beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i\neq j}\sum \beta_{ij} X_i X_j \qquad (3)$$

Y عبارت است از متغیر وابسته (بازیافت نیتروژنی)، β_0 و βi و βii و βij ثابت‌های برآوردشده توسط مدل هستند. X_i و X_j سطح متغیرهای مستقل بوده و آن‌ها به‌ترتیب نمایانگر اثرات خطی، درجه دوم و اثرات متقابل متغیرهای X_1، X_2 و X_3 روی پاسخ می‌باشند. این مدل اثر هر متغیر را روی پاسخ نشان می‌دهد.

جدول 1- متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده در بهینه‌سازی آبکافت آنزیمی سر و بازوی ماهی مرکب با استفاد از روش سطح پاسخ

متغیرهای مستقل	علامت	سطوح و حدود متغیرها		
		+1	0	-1
نسبت آنزیم به سوبسترا (درصد)	X_1	2	1/5	1
دما (درجه سانتی‌گراد)	X_2	55	50	45
pH	X_3	8/5	8	7/5

نتایج و بحث

بهینه‌یابی مدل

داده‌های مربوط به بازیافت نیتروژنی به‌عنوان متغیر وابسته در جدول 2 نشان داده شده است. بیشترین میزان بازیافت نیتروژنی مربوط به تیمار شماره 14 بود (36/7 درصد) که در آن نسبت آنزیم به سوبسترا 2 درصد، دما 50 درجه سانتی‌گراد و pH: 8/5 و کمترین بازیافت نیتروژنی (27/07 درصد) مربوط به تیمار 12 با نسبت آنزیم به سوبسترا 1 درصد، دما 45 درجه سانتی‌گراد و pH:8 بود.

نتایج آنالیز واریانس اثرات عوامل مختلف شامل نسبت آنزیمی، دما و pH بر بازیافت نیتروژنی در جدول 3 نشان داده شده است.

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چندجمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ می‌باشد. پایین‌تر بودن مقدار احتمال مدل از 0/05، نشان از معنی‌داری مدل داشت و R^2 =0/9666 بیانگر این بود که مدل رگرسیون واکنش را به‌خوبی توضیح داده است. مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش[1] مورد بررسی قرار گرفت که معنی‌دار نبود ($P>0/05$). بنابراین این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود

ضرایب رگرسیونی چندگانه به‌منظور پیش‌بینی مدل چند جمله‌ای درجه دوم برای متغیر پاسخ بصورت زیر به‌دست آمد:

$$DH = 33/56 + 1/81 (X_1) + 1/54 (X_2) + 1/01 (X_3) + 1/09 (X_1 X_3) + 1/08 (X_2 X_3) - 1/09 (X_1^2) - 2/08 (X_2^2) \qquad (4)$$

در مدل آزمایش، هر سه فاکتور به صورت مستقل، تاثیر بسیار معنی‌داری بر بازیافت نیتروژنی داشتند ($P<0/01$) و اثر متقابل آن‌ها در مورد نسبت آنزیم به سوبسترا و pH و همچنین دما و pH، معنی‌دار بود و اثر درجه‌ی دوم فقط در مورد pH معنی‌دار نبود ($P>0/05$)

جهت تعیین شرایط بهینه، نمودارهای سه‌بعدی و کانتر در شکل 1 ترسیم شد. در این اشکال که اثر متقابل دو متغیر را نشان می‌دهند، اثر متقابل نسبت آنزیم به سوبسترا و دما (شکل 1-الف) معنی‌دار نبود

1 Lack of Fit

($P>0/05$) و اثر متقابل نسبت آنزیم به سوبسترا و pH (شکل 1-ب) و اثر متقابل دما و pH (شکل 1-ج) معنی‌دار بود ($P<0/05$).

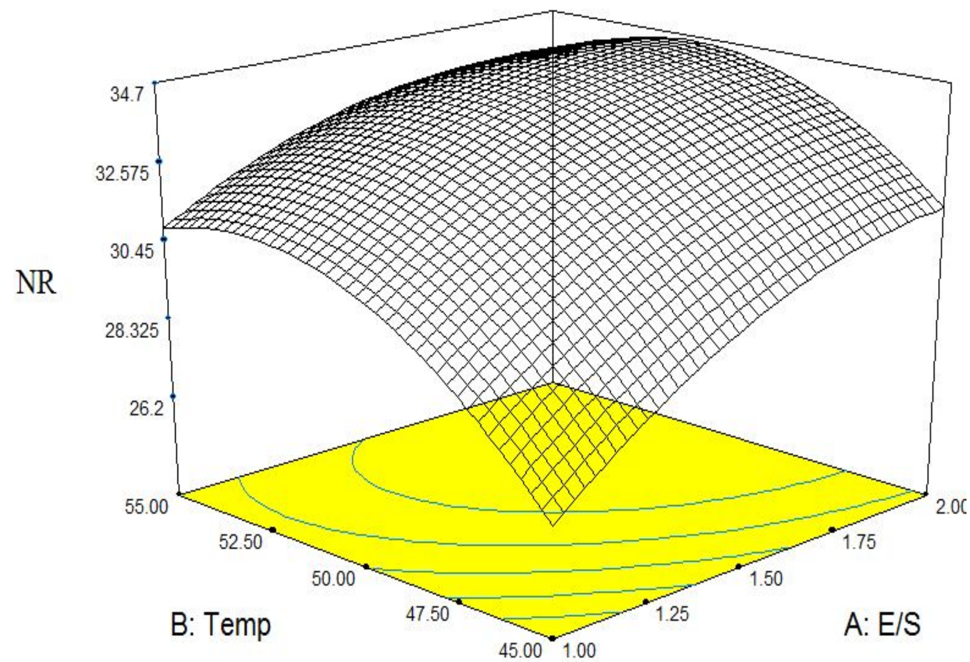
جدول 2- طرح آزمایشات بازیافت نیتروژنی سر و بازوی ماهی مرکب و مقدار بازیافت نیتروژنی واقعی و پیش‌بینی‌شده در طرح باکس-بنکن

تیمار	X_1 (آنزیم/سوبسترا) 1-2 (%)	X_2 (دما) 45-55 (C)	X_3(pH) 7/5-8/5	بازیافت نیتروژنی آزمایش	بازیافت نیتروژنی تخمین
1	0	0	0	33/22	33/56
2	0	+1	+1	35/77	35/26
3	+1	+1	0	32/4	33/09
4	-1	0	+1	30/62	30/72
5	0	0	0	33/44	33/56
6	0	-1	+1	29/44	30/02
7	-1	0	-1	30/7	30/88
8	+1	0	-1	32/44	32/34
9	-1	+1	0	30/37	30/78
10	0	-1	-1	29/66	30/17
11	0	0	0	34/03	33/56
12	-1	-1	0	27/07	26/38
13	+1	-1	0	31/74	31/33
14	+1	0	+1	36/7	36/52
15	0	+1	-1	31/66	31/08

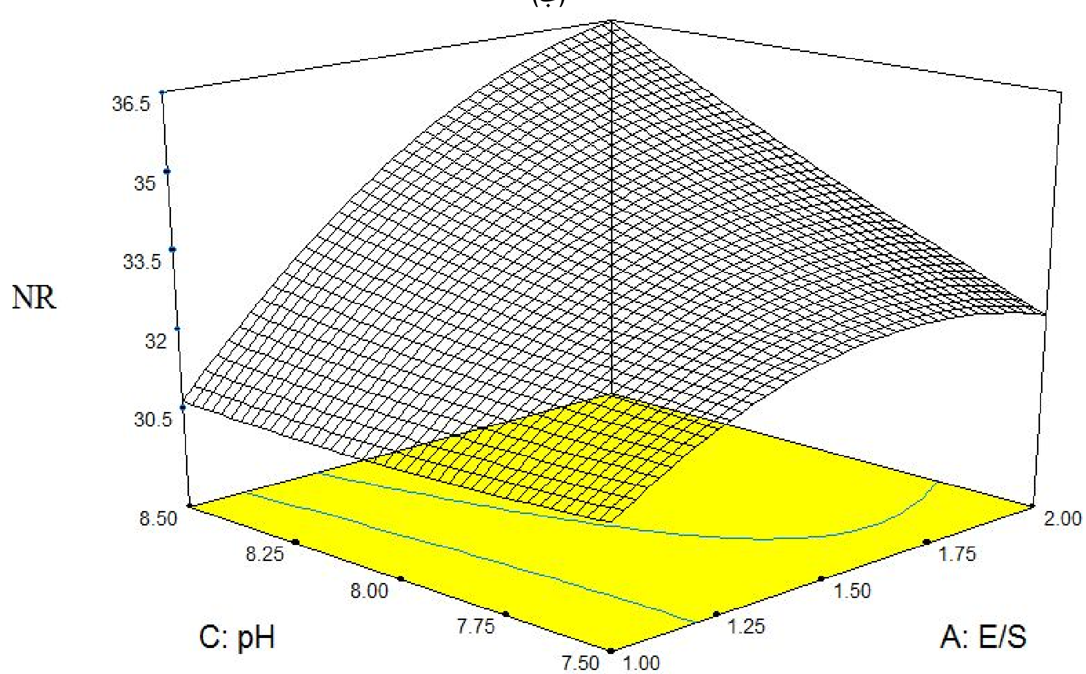
جدول 3- تجزیه و تحلیل واریانس (آنووا) مدل درجه دوم حاصل از سطح پاسخ جهت بازیافت نیتروژنی

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار p Prob> F
مدل	84/17	9	9/35	16/09	0/0035
X_1 (آنزیم/سوبسترا)	26/35	1	26/35	45/35	0/0011
X_2 (دما)	18/88	1	18/88	32/49	0/0023
X_3 (pH)	8/14	1	8/14	14/01	0/0134
X_1X_2	1/74	1	1/74	3/00	0/1439
X_1X_3	4/71	1	4/71	8/10	0/0360
X_2X_3	4/69	1	4/69	8/07	0/0362
X_1^2	4/41	1	4/41	7/59	0/0401
X_2^2	15/90	1	15/90	27/37	0/0034
X_3^2	0/077	1	0/077	0/13	0/7304
باقیمانده	2/91	5	0/58		
فقدان برازش	2/55	3	0/85	4/85	0/1756
خطای خالص	0/35	2	0/18		
کل	87/07	14			

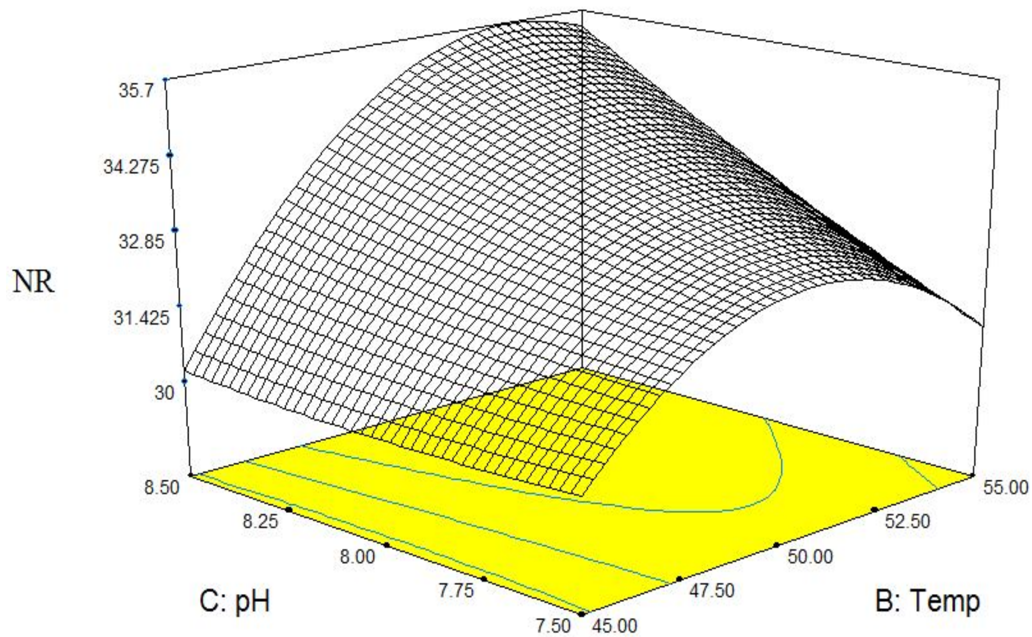
(الف)


NR
34.7
32.575
30.45
28.325
26.2
55.00
52.50
50.00
47.50
45.00
B: Temp
1.00
1.25
1.50
1.75
2.00
A: E/S

(ب)


NR
36.5
35
33.5
32
30.5
8.50
8.25
8.00
7.75
7.50
C: pH
1.00
1.25
1.50
1.75
2.00
A: E/S

(ج)



شکل 1- نمودارهای سه‌بعدی و کانتر اثر نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و pH بر بازیافت نیتروژنی
الف- نسبت آنزیم به سوبسترا و دما ب- نسبت آنزیم به سوبسترا و pH ج- دما و pH

در شکل 1-الف مشخص است که افزایش دما و نسبت آنزیم به سوبسترا با افزایش بازیافت نیتروژنی همراه است تا به نقطه‌ی بهینه که حداکثر بازیافت را به‌همراه دارد برسد. پس از آن با افزایش دما و نسبت آنزیم به سوبسترا، بازیافت نیتروژنی روند کاهشی را نشان داد که احتمالا به این دلیل است که افزایش دما با سرعت بخشیدن به واکنش بین آنزیم و سوبسترا باعث افزایش بازیافت نیتروژنی می‌گردد تا به دمای بهینه برسد، اما افزایش بیشتر، به علت دناتوره شدن آنزیم، کاهش فعالیت بیولوژیک آنزیم را سبب شده و بر بازیافت اثر منفی می‌گذارد (Kristinsson & Rasco, 2000; Nilsang *et al*., 2005; Wasswa *et a*l., 2007).

در شکل 1-ب که تغییرات بازیافت نیتروژنی در نسبت‌های مختلف آنزیم به سوبسترا و pH را نشان می‌دهد، مشخص شده است که در نسبت‌های آنزیم به سوبسترای پایین، تاثیر pH بر بازیافت نیتروژنی، کم می‌باشد ولی در نسبت‌های بالای آنزیم به سوبسترا، تاثیر pH بر بازیافت نیتروژنی افزایشی است، تا به نقطه بهینه خود برسد و پس از آن روند کاهشی به خود می‌گیرد. همچنین این شکل نشان می‌دهد که تاثیر نسبت آنزیم به سوبسترا بر بازیافت نیتروژنی در pHهای مختلف، ابتدا افزایشی است تا به حداکثر خود که بهینه بازیافت نیتروژنی است برسد، پس از آن، افزایش بیشتر نسبت آنزیم به سوبسترا با کاهش بازیافت نیتروژنی همراه است. با توجه به اینکه واکنش‌های کاتالیزشده آنزیمی همچون سایر واکنش‌های شیمیایی تنها در صورتی پیش می‌روند که با کاهش سطح انرژی آزاد اصلی همراه باشند، در نتیجه غلظت آنزیم به سوبسترا باید در سطح مشخصی باشد تا واکنش انجام گیرد و میزان فرآورده‌ی نهایی بهینه باشد (Barman, 1969). بنابراین با افزایش غلظت سوبسترا، آنزیم اشباع شده و فعالیت آنزیم به سمت حداکثر پیش می‌رود. اما در مطالعات کینتیک آنزیمی یک رابطه برهم‌کنشی بین میزان آنزیم و مقدار سوبسترا برقرار است و در یک نقطه یا محدوده بهینه، کارایی آنزیم حداکثر خواهد بود (Palmer, 1985). این مسئله می‌تواند توضیح دهد که چرا افزایش بیشتر میزان آنزیم مصرفی نمی‌تواند به تولید پروتئین با حداکثر بازیافت نیتروژنی منجر شود. مطالعه مشابه دیگر نظیر مطالعه‌ی Diniz و Martin (1996) بر روی عضله سگ-ماهی (*Squalus acanthias*) نیز نشان می‌دهد که افزایش میزان آنزیم با افزایش فعالیت آنزیم همراه است تا به نقطه‌ی بهینه برسد،

ولی افزایش فراتر از نقطه‌ی بهینه در میزان آنزیم، باعـث کـاهش در فعالیت آنزیم می‌شود.

شکل 1-ج بیانگر تغییرات بازیافت نیتروژنی در دماها و pHهای مورد آزمایش است که بیان می‌دارد افزایش دما باعث افزایش بازیافت نیتروژنی می‌شود تا به نقطه‌ی بهینه برسد و سپس بازیافت نیتروژنی روند کاهشی به خود می‌گیـرد. همچنـین بـالارفتن pH نیـز باعـث افزایش بازیافت نیتروژنی می‌شود، ولی این افزایش در دماهای پایین کمتر می‌باشد. pH مـی‌توانـد بـر حالـت یونیزاسـیون آمینواسـیدهای اسیدی و بازی اثر بگذارد. آمینواسیدهای اسیدی دارای گـروه عـاملی کربوکسیل و آمینواسیدهای بازی دارای گروه عاملی آمین در زنجیره جانبی خود می‌باشند. اگر حالت یونیزاسـیون آمینواسـیدهای پـروتئین تغییر کند، پیوندهای یونی کـه شـکل سـه‌بعـدی پـروتئین را تعیـین می‌کنند، تغییر می‌یابند. این می‌تواند منجـر بـه تغییـر در پـروتئین و غیرفعال‌شدن آنزیم گردد. pH تنها باعث تغییر شکل آنزیم نمی‌شود، بلکه ممکن است باعث تغییـر در شـکل یـا خـواص سوبسـترا گـردد بطوریکه هم سوبسترا نمی‌تواند به قسمت فعال آنزیم پیوند یابد و هم نمی‌تواند تحت تجزیه قرار بگیرد. به همین جهت هر آنزیم دارای pH بهینه است که با آنزیم دیگر متفاوت می‌باشد (BCH4053L, 2015). آلکالاز یک آنزیم قلیایی اسـت و بهینـه فعالیـت آن در pH: 8-8/5 می‌باشد (See *et al*., 2011).

شرایط بهینه توسط نرم‌افزا بدست آمد. هدف متغیرهای مسـتقل آزمایشات صورت‌گرفته، در محدوده و اعتبار آن‌ها، 3 تنظیم شد. هدف متغیر پاسخ یا همان بازیافت نیتروژنی نیز در حداکثر و اعتبـار آن، 5 تنظیم گردید. بعد از تنظیم محدوده‌ها، نرم‌افزار، نقاط بهینه را به‌دست آورد که شرایط بهینه آبکافت از لحاظ بازیافت نیتروژنی برای پروتئین آبکافت‌شده با درجه مطلوبیت 1 بدین صورت بود: نسـبت آنـزیم بـه سوبسترا 1/92 درصد، دمای 52/69 درجه سانتی‌گراد و pH 8/50 که منجر به تولید پروتئین آبکافت‌شده با بازیافت نیتروژنی 36/89 درصد گردید.

به‌منظور تایید شرایط پیشنهادشده از نظر نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و pH توسط معادله ریاضی، آزمایشی تحت شرایط پیش‌بینی شده مدل، اجرا گردید (در سه تکرار) که در این شرایط پروتئین آبکافت‌شده با بازیافت نیتروژنی 37/59 درصد به‌دست آمد. این مقدار تقریباً مطابق با مقدار پیش‌بینی شده توسط مدل بود که بیانگر شرایط بهینه جهت تولید پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب ببری از نظر بازیافت نیتروژنی می‌باشد و برای بررسی‌های بعدی از این پـروتئین اسـتفاده شد.

ترکیب اسیدآمینه

نتایج مربوط به ترکیب اسیدهای آمینه کل پروتئین آبکافت‌شـده ماهی مرکب در جدول 4 آمده است. بـر اسـاس ایـن جـدول نسـبت اسیدهای آمینه‌ی ضروری به کل اسیدهای آمینه 55 درصد و نسـبت اسیدهای آمینه ضروری به انواع غیرضروری 1/25 بدست آمد.

جدول 4- ترکیب اسیدهای آمینه کل پروتئین آبکافت‌شده سر و بازوی ماهی مرکب

اسیدآمینه (گرم در 100 گرم پروتئین)	پودر پروتئینی	اسیدآمینه (گرم در 100 گرم پروتئین)	پودر پروتئینی	اسیدآمینه (گرم در 100 گرم پروتئین)	پودر پروتئینی
***هیستیدین**	8/14	تیروزین	2/97	گلایسین	5/64
***ایزولوسین**	4/65	*ترئونین	3	سرین	3/35
***لوسین**	7/19	*آرژنین	11/61	گلوتامیک‌اسید	13/66
***لیزین**	6/94	*والین	3/88	پرولین	4/57
***متیونین**	3/83	آلانین	3/47	هیدروکسی‌پرولین	1/65
***فنیل آلانین**	3/63	آسپارتیک‌اسید	6/51	سیستئین	0/35

* اسیدهای آمینه ضروری

آمارهـای سـازمان‌هـای جهـانی FAO/WHO (1990) نشـان می‌دهد که برای انسان بالغ، نسبت اسیدهای آمینه ضروری بـه کـل اسیدهای آمینه نباید از 40 درصد و نسبت اسیدهای آمینه ضروری به غیرضروری نباید از 0/6 کمتر باشد. که نشان می‌دهد مقدار اسیدهای آمینه‌ی پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب از مقدار اسـتاندارد جهانی بیشـتر و از کیفیـت مناسـبی برخـوردار اسـت. اویسـی‌پـور و همکاران (1389)، نسبت اسیدهای آمینه ضروری بـه کـل اسـیدهای آمینـه را بـرای پـروتئین آبکافـت‌شـده امعـاء احشـاء تـون زرد بالـه (*Thunnus albacares*) با استفاده از آنزیم آلکـالاز 55/4 درصـد و برای اسیدهای آمینه ضروری به غیرضروری 1/47 به دست آوردند که مشابه با نتیجه‌ی این تحقیق بود.

از طرف دیگر نسبت اسـیدهای آمینـه طعـم‌زا (آسـپارتیک‌اسـید، گلایسین، آلانین و گلوتامیک‌اسید) به کل اسیدهای آمینه در پروتئین آبکافتی حاصل از شرایط بهینه سر و بازوی مـاهی مرکـب برابـر بـا

30/81 درصد بود. اویسی پور و همکاران (1389)، این نسبت را برای پروتئین آبکافت شده امعاء و احشاء ماهی تن زرد بالـه بـا اسـتفاده از آنزیم‌های تجاری بین 35 تا 37 درصد و Coa و همکاران (2008) نیز در آزمایش خود بر روی آبکافت سر میگو این نسبت را بین 37/12 تا 39/18 درصد بدست آوردند که در هر دو مطالعه این مقادیر را بالا و مناسب گزارش نمودند. با توجه به این گزارشات می‌توان بیـان نمـود که نسبت اسیدهای آمینه طعم‌زا به کل اسیدهای آمینه در این مطالعه در میزان مناسب قرار داشتند.

از طرفی میزان اسیدآمینه آرژنین در پروتئین آبکافتی قابل توجـه بود. اسیدآمینه آرژنین، یک اسیدآمینه مهم در ترکیب پروتئین می‌باشد و نقش مهمی در سنتز پروتئین‌ها، کاهش سمیت مواد، تبادلات انرژی (Cao *et al*., 2008) و کاهش بیماری‌های قلبی عروقی (Niittynen *et al*., 1999) ایفا می‌کند.

شاخص شیمیایی

شاخص شیمیایی پروتئین آبکافت‌شده حاصل از شرایط بهینه سر و بازوی ماهی مرکب در جـدول 5 نشـان داده شـده اسـت. در ایـن جدول، میزان شاخص شیمیایی اسیدهای آمینه با اسیدهای آمینه مورد نیاز انسان (FAO/WHO, 1990)، اسیدهای آمینه مـورد نیـاز کپـور (NRC, 1993) و اسـیدهای آمینـه ضـروری موجـود در شـیر گـاو (Salmen *et al*., 2012) مقایسه شده است.

جدول 5- شاخص شیمیایی پروتئین آبکافت شده سر و بازوی ماهی مرکب ببری

آمینو اسید*	پروتئین مرجع [1]	پروتئین آبکافت‌شده	پروتئین مرجع [2]	پروتئین آبکافت‌شده	کازئین شیر گاو[3]	پروتئین آبکافت‌شده
هیستیدین	1/6	5/08	2/1	3/87	2/97	2/74
ایزولوسین	1/3	3/57	2/5	1/86	4/64	1/00
لوسین	1/9	3/78	3/3	2/17	8/24	0/87
لیزین	1/6	4/33	5/7	1/21	9/78	0/70
متیونین	1/7	2/25	3/1	1/23	2/66	1/43
فنیل‌آلانین	-	-	6/5	0/55	4/62	0/78
ترئونین	0/9	3/33	3/9	0/76	4/00	0/75
آرژنین	-	-	1/31	8/86	3/53	3/28
والین	1/3	2/98	3/6	1/07	6/17	0/62

* گرم در 100 گرم پروتئین

1- پروتئین مرجع بر اساس نیاز انسان به اسیدهای آمینه (FAO/WHO, 1990).

2- پروتئین مرجع بر اساس نیاز ماهی کپور به اسیدهای آمینه (NRC, 1993).

3- ترکیب اسیدهای آمینه ضروری کازئین شیر گاو (Salmen *et al*., 2012).

همانگونه که مشاهده می‌شود پروتئین آبکافت‌شده تحقیق حاضر می‌تواند نیاز یک انسان بالغ را به اسیدهای آمینه ضروری فراهم کند. نتایج مشابهی در مورد پروتئین آبکافت‌شده سایر ماهیان گزارش شده است (Ovissipour *et al*., 2009a; Ovissipour *et al*., 2009b; Bhaskar *et al*., 2008).

Ovissipour و همکاران (2009 a,b) گزارش نمودند که پروتئین آبکافـت شـده امعـاء و احشـاء تـاس مـاهی ایرانـی (*Acipenser persicus*) و فیل ماهی (*Huso huso*)، نیازهای یک انسان بالغ را به اسیدهای آمینه تامین می‌کنند. اما در مقایسه ترکیب اسیدهای آمینـه این پروتئین با نیازهای پروتئینی مـاهی کپـور مـی‌تـوان گفـت کـه اسیدهای آمینه فنیل‌آلانین و ترئونین، اسیدهای آمینـه محدودکننـده محسـوب مـی‌شـوند. Ovissipour و همکـاران (2009 a,b)، اعـلام نمودند که مهمترین اسیدآمینه‌ی محدودکننده، در پروتئین آبکافت‌شده امعاء و احشاء تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و فیل‌ماهی (*Huso huso*)، اسیدآمینه فنیل‌آلانین مـی‌باشـد. همچنـین مقایسـه شاخص شیمیایی پودر پروتئین آبکافت‌شده ماهی مرکب با اسـیدهای آمینه‌ی ضروری در کازئین شیر گاو نشان داد که اسـیدهای آمینـه‌ی لوسین، لیزین، فنیل‌آلانین، ترئونین و والین کمتر از مقدار موجـود در کازئین شیر گاو بوده و محدودکننده می‌باشند.

Motamedzadegan و همکـاران (2011)، در بررسـی شـاخص شیمیایی پروتئین آبکافت شده‌ی امعا و احشاء مـاهی تـون زرد بالـه، دریافتند که این پروتئین نیازهای تغذیه‌ای یک فرد بالغ را به غیـر از متیونین تامین می‌کنند و برای نیازهای ماهی کپور، لیزین، متیونین و فنیل آلانین به ترتیب اسیدهای آمینه محدود کننده بودند.

نرخ کارایی پروتئین

نتایج مربوط به نرخ کارایی پروتئین در جدول 6 نشان داده شده است. این نتایج نشان داد که پروتئین آبکافت‌شده ماهی مرکب نرخ کارایی پروتئین بالایی دارد که نرخ کارایی پروتئین برای این پروتئین آبکافتی بین 2/37-4/37 به‌دست آمد. این میزان برای ماهی کاد (*Gadus murhus*) و کاپلین (*Mallotus villosus*) به‌ترتیب 3/24-2/86 و 3/11-2/61 گزارش شده است (Shahidi *et al*., 1991; Shahidi *et al*., 1995). بر اساس ترکیب اسیدآمینه‌ی کازئین شیر گاو که توسط Salmen و همکاران (2012) گزارش شده است، نرخ کارایی پروتئین کازئین شیر گاو 3/13-1/7 است که در مقایسه بین نرخ کارایی پروتئین آبکافت‌شده سر و بازوی ماهی مرکب با نرخ کارایی پروتئین کازئین شیر می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین آبکافتی سر و بازوی ماهی مرکب نرخ کارایی بالایی دارد.

جدول 6- نرخ کارایی پروتئین آبکافت‌شده سر و بازوی ماهی مرکب ببری و کازئین شیر

	معادله	پروتئین آبکافت‌شده	کازئین[1]
1	(پرولین) 0/047 – (لوسین) 0/456 + 0/684 -	2/37	-
2	(تیروزین) 0/104 – (لوسین) 0/454 + 0/468 -	2/48	2/75
3	(تیروزین) 0/944 – (هیستیدین) 0/211 + (لوسین) 0/780 + (متیونین) 0/435+ 1/816 -	4/37	1/70
4	0/08084 (A) 0/1094	2/56	3/13
5	0/06320 (B) – 0/1539	3/37	3/10

A: مجموعه اسیدهای آمینه لوسین، ایزولوسین، فنیل‌آلانین، لیزین، ترئونین، والین، متیونین

B: مجموع اسیدهای آمینه A و هیستیدین، آرژنین و تیروزین

(Salmen *et al*., 2012)

منابع

Ahmad, M., Benjakul, S., Oissipour, M., & Prodpran, T., 2011, Indigenous proteases in the skin of unicorn leatherjacket (*Alutherus monoceros*) and their influence on characteristic and functional properties of gelatin. *Food chemistry*, 127, 508-515.

Alsmeyer, R. H., Cunningham, A.E., & Happich, M., 1974, Equations predict PER from amino acid analysis. *Food Technology*, 28(7), 34-40.

AOAC, 2005, Association of Official Analytical Chemists International. Washington DC, 18th Ed, 238.

Barman, T. E., 1969, Enzyme handbook, Berlin Heidelberg. New York: Springer, Vol 2. 508

BCH4053L, 2015, Kinetics: Determination of an Enzymes Activity - Relevance [Online]. http://www.chem.fsu.edu/chemlab/bch4053l/enzymes/activity/index.html].

Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., & Lalitha, R. G., 2008, Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (Catla catla) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99 (2), 335–343.

Cao, W., Zhang, C., Hong, P., & JI, H., 2008, Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis. *Food chemistry*, 109, 176-183.

Diniz, F. M., & Martin, A. M., 1996, Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International journal of food science & technology*, 31, 419-426.

Diniz, F.M., & Martin, A.M., 1997, Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. *Internaliorrd Jourticd of Fond Sciences und Nutrition*, 48, 191-200.

FAO, 2013, Food and Agricultural Organization Yearbook, Fishery Statistics, Catches and Landings, [Online], [http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-production/query/en].

FAO/WHO, 1990, Energy and protein requirements, Report of joint FAO/ WHO/UNU Expert Consultation Technical Report., FAO/WHO and United Nations University, Geneva, 724, 116–29.

Guerard, F., Guimas, L., & Binet, A., 2002, Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Journal of Molecular Catalysis B: *Enzymatic*, 19, 489-498.

Haltrich, D., Laussamayer, B., Steiner, W., Nidetzky, B., & Kulbe, K. D., 1994, Cellulolytic and hemicellulolytic enzymes of Sclerotum rolfsii: Optimization of the culture medium and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. *Bioresource Technol*, 50, 43-50.

Heinrikson, R. L., & Meredith, S. C., 1984, Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical biochemistry*, 136, 65-74.

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A., 2000, Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties.

Critical reviews in food science and nutrition, 40, 43-81.

Layne, E., 1957, Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in enzymology, 3, 447-454.

Lee, Y.B., Elliot, J.G., Rickansrud, D.A., & Mugberg, E.C., 1978, Predicting protein efficiency ratio by the chemical determinations of connective tissue content in meat. *Journal of Food Science*, 43, 1359–1362.

Liaset, B., Lied, E., & Espe, M., 2000, Enzymatic hydrolysate of by-product from the fish-filleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. *Journal of the Science of food and Agriculture*, 80, 581-589.

Martin, A.M., & Porter, D., 1995, Studies on the hydrolysis of fish protein by enzymatic treatment. In Food Flavours: Generation, Analysis and Process Influence. (Eds.), G. Charalambous. Amsterdam: Elsevier Science, 1395-1404.

Motamedzadegan, A., Davarniam, B., Asadi, G., Abedian Kenari, A., & Ovissipour, M. R, 2011, Optimization of enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) viscera using Neutrase. *International Aquatic Research*, 2, 173-181.

Niittynen, L., Nurminen, M.-L., Korpela, R., & Vapaatalo, H., 1999, Role of arginine, taurine 4 and homocysteine in cardiovascular diseases. *Annals of medicine*, 31, 318-326.

Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., & Assavanig, A., 2005, Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of food Engineering*, 70, 571-578.

NRC, 1993, National Research Council. National Academy of Sciences, Nutrient Requirements of Fish. Washington, USA, 124.

Ovissipour, M. R, Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., & Shahiri, H., 2009a, the effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115, 238-242.

Ovissipour, M. R, Safari, R., Motamedzadegan, A., & Shabanpour, B., 2012, Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 460-465.

Ovissipour, M. R, Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., & Molla, A. E., 2009b, Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeon (*Huso huso*) using Alcalase. *International Aquatic Research*, 1, 31-38.

Ovissipour, M.R., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., & Nazari, R.M., 2010. The Study on The Properties of The Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Visceral Protein Hydrolysates Using Commercial Enzymes. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 6 (1), 68-76.

Palmer, T., 1985, Understanding Enzymes. Ellis Horwood, Chicheste. 2rid Ed. 164-165.

Quaglia, G., & Orban, E., 1987, Enzymic solubilisation of proteins of sardine (Sardina pilchardus) by commercial proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 38, 263-269.

Salmen, S. H., Abu-Tarboush, H. M., Al-Saleh, A. A., & Metwalli, A. A., 2012, Amino acids content and electrophoretic profile of camel milk casein from different camel breeds in Saudi Arabia. *Saudi journal of biological sciences, 19, 177-183.*

See, S. F., Hoo, L. L., & Babji, A. S., 2011, Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. *International Food Research Journal*, 18(4), 1359-1365.

Shahidi, F., Han, X. Q., & Synowiecki, J., 1995, Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food chemistry*, 53, 285-293.

Shahidi, F., Naczk, M., Pegg, R. B., & Synowiecki, J., 1991, Chemical composition and nutritional value of processing discards of cod (*Gadus murhus*). *Food Chemistry*, 42, 145-151.

Surowka, K., & Fik, M., 1992, Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate. *International journal of food science & technology*, 27, 9-20.

Valinasab, T., Keivan, A., Emadi, H., & Oryan, S., 2001. Morphometric study of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) in Persian Gulf and Oman Sea. *Iranian Journal of fisheries Science*. 9 (4), 79-92.

Wasswa, J., Tang, J. G. U, X-H., & Yuan, X-Q., 2007, Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, 104, 1698-1704.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 4, Oct- Nov 2017, p. 491-502

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 4، مهر - آبان 1396، ص. 502-491

Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of head and arms of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) protein using Alcalase

K. Ali asgari[1], S. Yeganeh*[2], S. A. Jafar pour[2], R. Safari[3]

Received: 2015.11.02
Accepted: 2016.04.30

Introduction: Nowadays, use of new processing method is important for converting by-products into more marketable and acceptable forms to achieve a better utilization. Sea food processing generate protein rich by-products that their quantity depends on processing method. One of the methods for effective protein recovery from this protein rich by-product is preparation of protein hydrolysate through enzymatic, autolytic and chemical hydrolysis. Enzymatic hydrolysis is widely employed to improve the functional and nutritional properties of the fish byproducts. Hydrolysis may be conducted as a method of separating soluble nitrogenous compounds from insoluble particles and fish oil, and offers good predictability of the products. So nitrogen recovery assay can determine enzyme efficiency in separation of soluble protein from insoluble protein. Different factors (Enzyme level, temperature, pH, enzyme to substrate ratio) can effect on the hydrolysis degree, nitrogen recovery and functional properties of protein hydrolysate, so optimization method is used for obtaining the best condition. RSM is a statistical model frequently used for the optimization of complex systems and uses quantitative data from an appropriate experimental design to determine and simultaneously solve multivariate problems. Based on the experimental data, RSM could tell us the optimum conditions to obtain the desired responses, as well as the mathematical model in explaining the relationship between the experimental variables and its responses. Alcalase has great ability to solubilize fish protein and is nonspecific, with an optimum temperature that ranged from 50 to 70°C. It has optimal pH range at the value of 8 to 10 that could reduce the risk of microbial contaminations. Moreover, it has been reported that produced protein hydrolysate by Alcalase had less bitter principles compared to those prepared with papain. Furthermore Alcalase has been documented to be a better candidate for hydrolyzing fish proteins based on enzyme cost per activity.

The Cuttlefish (*Sepia officinalis*) can be found in the south water of Iran including Persian Gulf and Oman Sea and their catch has been recorded about 5102 t according to FAO Statistic. This species has been considered for exporting to other country. During Cuttlefish processing, 30-35 % byproducts including head, arms and viscera are generated that can be invaluable products and environmental pollution while it is protein rich source. The objective of this study was to optimize nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of head and arms of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) using Alcalase.

Materials and methods: Response surface methodology (RSM) based on Box-Behnken was employed to investigate the effects of different operating conditions including temperature (45, 50 and 55˚C), pH (7.5, 8 and 8.5) and alcalase enzyme to substrate ratio (1, 1.5 and 2) on the nitrogen recovery as a surface response. Referring to the R^2 of 0.96 for nitrogen recovery, the mathematical model showed acceptable fitness with the experimental data, which indicated that major part of the variability within the range of values studied could be explained by the model.After obtaining optimum condition for nitrogen recovery, freeze dried protein powder was produced by optimized condition and analyzed for amino acid composition, chemical score of cuttlefish protein hydrolysate and protein efficiency ratio.

Results & Discussion: The obtained results showed the interactive effect of temperature and enzyme to substrate ratio was not significant (P> 0.05) but the interaction effect of enzyme to substrate ratio and pH and the interaction effect of temperature and pH was significant (P<0.05). Nitrogen recovery was improved by increasing temperature, pH and enzyme to substrate ratio to optimum level because of temperature caused to increase the reaction between enzyme and substrate but excessive temperature result to enzyme denaturation. pH can influence on hydrolysis due to changing amino acid charges of enzyme and substrate characteristic. Higher

1 And 2. M.Sc. Graduated and Associate Professor, Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari
3. Iranian Fisheries Research Organization, Caspian Sea Ecology Research Center, Sari.
(Corresponding author's Email: skyeganeh@gmail.com)

enzyme concentrations caused more active sites available for the substrate to be hydrolyzed. The optimum values for temperature, pH and enzyme to substrate ratio were determined to be 52.69 ˚C, 8.5 and 1.92% respectively, which resulted in nearly 36.89% nitrogen recovery. Based on the lack of fitness factor which was not significant, it is concluded that the resulted model is capable of prediction at different levels of variables. Amino acid composition from optimized conditions of protein hydrolysis showed that this protein has a high nutritional value. Essential amino acids such as phenylalanine, valine, threonine, arginine, methionine, leucine, isoleucine, lysine, and histidine to total amino acid ratio and essential amino acid to non-essential amino acid (alanine, aspartic acid, glycin, serine, glutamic acid, proline, hdroxyproline and cysteine) ratio obtained 55 % and 1.25 %, respectively. Arginine is an important amino acid that observed 11.61 (g per 100 g protein) in Cuttle fish head and arms protein hydrolysate. Chemical score of head and arms of cuttlefish protein hydrolysate showed that this protein has a high amount of essential amino acids and could provide the essential amino acids (Standard protein FAO/WHO) for adult human requirements, but phenyl alanine and threonin are limiting compared to requirements of common carp (Standard protein NRC). Protein efficiency ratio of this hydrolysate was 2.37-4.37 that showed high protein efficiency compared to casein of milk.

Keywords: Hydrolysis; Alcalase; Nitrogen recovery; Optimization; Cuttlefish